

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
9. Jg., S. 295—303, Juli 1971

Friedrich von Müller-Gedächtnisvorlesung 1969<sup>1)</sup>

Münchener Beiträge zur Kenntnis der Urobilinoide, zugleich neuere Studien<sup>2)</sup>

Von C. J. WATSON

*University of Minnesota, Department of Medicine, and University Medical Unit, Northwestern Hospital  
(Direktor: Regents' Prof. emer. Dr. Dr. h. c. C. J. Watson), Minneapolis, Minn., USA.*

(Eingegangen am 30. Oktober 1970)

Lassen Sie mich bitte zunächst dafür danken, daß mir die hohe Ehre zuteil wurde, die jährliche FRIEDRICH V. MÜLLER-Gedächtnisvorlesung hier in München zu halten. Die Einladung des Ärztlichen Vereins München hat für mich eine außerordentliche Bedeutung. Denn es war mein großes Glück, 1930—1932 zu Füßen FRIEDRICH V. MÜLLER's seine großartigen klinischen Vorlesungen in dem alten Hörsaal des Krankenhauses links der Isar zu hören. Diejenigen unter Ihnen, die auch dieses Glück hatten, werden sich erinnern, wie überfüllt der kleine Hörsaal bei seinen Vorlesungen war, so daß viele Studenten und Assistenten unten um ihn herumstanden. Als FRIEDRICH V. MÜLLER merkte, wie hilflos ich in diesem Geraufe um einen Platz war, arrangierte er es netterweise, daß ich in der kleinen Projektionskabine sitzen durfte, angenehm nahe bei seinen klinischen Demonstrationen, so nahe, daß ich jedes Wort hören und das meiste, was er sagte, auch verstehen konnte. Seine Gedankengänge und seine Ausdrucksweise waren so klar und so verständlich, daß ich dort beim Zuhören die deutsche Sprache beherrschen lernte. Lassen Sie mich bitte an dieser Stelle meinem Kollegen CLAUS PIERACH aus Mainz herzlichst danken für seine Hilfe bei der Vorbereitung dieser Vorlesung. Auch möchte ich hier meiner alten Freunde ALEXANDER PIERACH und RICHARD DUESBERG gedenken. Beide waren damals Assistenten an FRIEDRICH V. MÜLLER's Klinik, letzterer auch mit mir in HANS FISCHER's Labor.

Viele unter Ihnen, die FRIEDRICH V. MÜLLER gehört haben, werden sich erinnern, wie breit sein Gesichtskreis war und wie wenig er die enge Spezialisierung in der Medizin mochte. Als ich ihn bei meinem Abschied im Frühling 1932 zum letztenmal sah, bat er mich, nicht zu vergessen, daß er ein Professor der Medizin, nicht der Inneren Medizin sei. Wenn man seine Lebenserinnerungen liest, versteht man jenes breite Interesse, das ihn charakterisierte und das die treibende Kraft

während seiner langen Jahre des medizinischen Unterrichts war.

FRIEDRICH V. MÜLLER's Interesse an den Gallenfarbstoffen hielt sein Leben lang an. Er leistete zwei große Beiträge zum Urobilin-Problem. Der eine war direkt, der andere indirekt, aber äußerst wichtig. Der erste Beitrag war jener klassische Versuch (1), der Ihnen allen bekannt ist; er gab einem Patienten mit komplettem karzinomatösem Gallenwegsverschluß Schweinegalle. Vor dem Experiment ließ sich in den Exkrementen des Patienten kein Urobilin nachweisen. Das Auftreten von Urobilin in Stuhl und Urin in den Tagen nach der Zufuhr von Schweinegalle erbrachte den Beweis zugunsten der enterogenen Natur des Urobilins. Ich kenne wohl den späteren Einwand (2), daß die zugeführte Schweinegalle doch etwas Urobilinogen hätte enthalten können, da damals die EHRLICHsche Aldehydreaktion noch nicht bekannt war und das Gegenteil nicht bewiesen werden konnte. Ich glaube aus eigener Erfahrung, daß die von FRIEDRICH V. MÜLLER gebrauchte Zink-Probe schnell positiv geworden wäre, wenn eine bedeutende Menge Urobilinogen vorhanden gewesen wäre. Wie Sie alle wissen, war FRIEDRICH V. MÜLLER nicht nur ein großer Kliniker, sondern auch ein begeisterter klinischer Biochemiker und das erleichtert es mir, nun vorwiegend über die Chemie der Urobilinoide zu Ihnen zu sprechen.

Der große indirekte Beitrag bestand darin, daß FRIEDRICH V. MÜLLER die so erfolgreichen Arbeiten HANS FISCHER's im chemischen Laboratorium an der II. Medizinischen Klinik in München möglich machte und förderte. Erinnern Sie sich daran, daß HANS FISCHER sich an dieser Klinik in Innerer Medizin habilitierte, nachdem er zuvor in organischer Chemie zum Dr. phil. promoviert hatte. Zur gleichen Zeit begann er seine Studien an den Gallenfarbstoffen. SIEGFRIED TANNHAUSER, damals auch Assistent bei FRIEDRICH V. MÜLLER, erzählte mir einmal, daß er ein Abkommen mit FISCHER hatte, dahingehend, daß er FISCHER's klinische Verpflichtungen erleichtern wolle, wenn FISCHER ihn dafür in Chemie unterrichtete. Es ist berechtigt zu sagen, daß die ersten gut fundierten Kenntnisse der Chemie des Urobilins und auch der Porphy-

<sup>1)</sup> Gehalten am 16. Oktober 1969, in der Chirurgischen Universitäts-Klinik München. Mit Unterstützung der National Science Foundation und des United States Public Health Service.

<sup>2)</sup> Die Symbole d, l und i werden hier vom Autor für die Bezeichnung des optischen Drehungssinnes verwendet: d = dextrogyr, rechtsdrehend; l = laevogyr, linksdrehend; i = optisch inaktiv. Sie machen keine Aussage über die Konfiguration.

rine in FRIEDRICH v. MÜLLER's Klinik gewonnen wurden. Die Kristallisation des Urobilinogens 1911 war FISCHER's erster großer Beitrag (3, 4). Es ist leicht zu verstehen, daß FRIEDRICH v. MÜLLER außerordentlich stolz war über FISCHER's glänzende Erfolge. Als er einmal eine Vorlesung über den Ikterus hielt, hatte ich das Vergnügen zu hören, wie er seine oft zitierte Bemerkung über HANS FISCHER machte: „Er spuckt in die Hand, und es kristallisiert sofort aus.“

Ich werde gleich nochmals auf FISCHER's frühen Erfolg zurückkommen, doch lassen Sie mich zunächst noch einige interessante geschichtliche Meilensteine erwähnen. Vor einem Jahr waren es genau 100 Jahre her, seit JAFFÉ (5) das Urobilin entdeckte, und zwar im Urin und in der Galle. Drei Jahre nach dieser Entdeckung beobachteten VAN LAIR und MASIUS (6) eine ähnliche oder identische Verbindung im Stuhl, gaben ihr aber vorsichtshalber den Namen Stercobilin. Wie wir später sehen werden, war diese Vorsicht Voraussetzung. Es war auch im Jahre 1871 als R. MALY (7) zum erstenmal Bilirubin mit Natriumamalgam zu einer urobilinartigen Substanz reduzierte, die jedoch nicht kristallisierte und sicherlich nicht rein war. Doch war MALY der erste, der daran dachte, daß eine bakterielle Reduktion im Colon für die Bildung von Urobilin verantwortlich wäre. Sicher war es auch teilweise diese Theorie, die zum oben erwähnten berühmten Experiment FRIEDRICH v. MÜLLER's führte. JAFFÉ hatte schon erkannt, daß Urobilin wenigstens zum Teil als farbloses Chromogen vorlag, das leicht durch Luft und Licht zum Farbstoff umgewandelt werden konnte. Es dauerte jedoch noch bis 1887 als LE NOBEL (8) diesem Chromogen schließlich den einleuchtenden Namen Urobilinogen gab. Weitere 14 Jahre mußten vergehen, ehe PAUL EHRLICH (9) die Aldehydreaktion, in gewissen Urinen entdeckte, ganz besonders bei Leberkranken. Die Beziehung zwischen der Aldehydreaktion und dem Urobilinogen im Urin wurde erstmals von OTTO NEUBAUER 1903 in FRIEDRICH v. MÜLLER's Klinik diskutiert (10). Natürlich war diese Reaktion für HANS FISCHER von größtem Wert, als er erstmals Urobilinogen kristallisierte, denn sie erlaubte, die Reindarstellung zu verfolgen. Die Kristalle, die FISCHER erhielt, wurden zuerst Hemibilirubin, aber schließlich Mesobilirubinogen benannt. Meines Erachtens ist dieser Name auch nicht ganz zutreffend, da er ein reversibles Chromogen-Pigment-Verhältnis vorschlägt, was den Tatsachen weniger entspricht. Urobilin, statt Mesobilirubin, ist das Hauptprodukt der einfachen Dehydrierung. Daher habe ich eher den Namen Urobilinogen gebraucht.

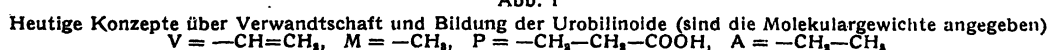
Im gleichen Jahr isolierten FISCHER und MEYER-BETZ (4) identische Kristalle aus dem Urin eines Patienten mit Lebercirrhose. Als Ergebnis dieser Arbeit stellte sich heraus, daß synthetisches Mesobilirubinogen kristallographisch identisch mit jenem Urobilinogen war, das aus Harn kristallisiert wurde. Später werde ich jedoch auf stereochemische sowie strukturelle Unterschiede zwischen der synthetischen Substanz und den

natürlichen Chromogenen zu sprechen kommen. Nach FISCHER's Veröffentlichungen 1911 blieb die Frage offen, ob natürliches kristallisiertes Harn-Urobilinogen mit dem Stercobilinogen aus Stuhl identisch war. Neben den grundlegenden rein wissenschaftlichen Aspekten dieser Frage war die Antwort für die Eichung kolorimetrischer Bestimmungen entscheidend. Dies war von besonderer Bedeutung für Studien des Hämoglobinstoffwechsels und der Gelbsucht. Und diesem Problem habe ich mich zugewandt, als ich im Herbst 1930 an FRIEDRICH v. MÜLLER's Klinik ging. Ich habe ihm das erzählt, und wir haben selbstverständlich die Möglichkeit erwogen, ob ich eine Zeitlang in HANS FISCHER's Labor an der Technischen Hochschule arbeiten sollte. Es kam dann so, daß er HANS FISCHER anrief und ihn fragte, ob er mich nähme. Sehr schnell hatte ich dann einen Arbeitsplatz in FISCHER's Laboratorium und konnte mich dem Versuch zuwenden, Stercobilinogen aus dem Stuhl zu kristallisieren. Mit FISCHER's Einverständnis versuchte ich, eher das Chromogen als den Farbstoff zu kristallisieren, denn es gab schon mehrere erfolglose Ansätze, darunter auch solche von mir aus den Jahren 1926—28, Stercobilin aus Stuhl zu kristallisieren. Zwar hat FISCHER selbst diesem Problem viel Arbeit gewidmet: aus einer Kollektion von mehr als 1000 Stühlen hat er ein sogenanntes „Urobilin“ erhalten, das sich aber bei eingehender Analyse nicht als einheitliche chemische Substanz erwies (3). Er hat mir einmal erzählt, welche Schwierigkeiten er hatte, das Ausgangsmaterial vom Spital ins Labor zu bringen: der Straßenbahnschaffner erhob strengste Einwände und warf den Herrn Professor hinaus.

Es war mit gutem Grund anzunehmen, daß das Chromogen leichter auskristallisieren könnte. Zu diesem Zwecke habe ich Ausgangsmaterial von Fällen mit hämolytischer Anämie bzw. Ikterus aus dem Krankenhaus links der Isar in die Technische Hochschule transportiert, aber nie mit der Straßenbahn, sondern stets als ganz privates Unternehmen auf meinem Fahrrad. Leider scheiterten die Versuche, und bis heute konnte noch kein natürliches Stercobilinogen kristallisiert werden. Es gelang jedoch kürzlich PETRYKA (11) in unserem Labor ein kristallines Stercobilinogen zu synthetisieren, das sich aber zweifellos stereochemisch von der natürlichen Verbindung unterscheidet.

Trotz meiner Enttäuschung wegen des natürlichen Stercobilinogens führten meine Arbeiten in FISCHER's Labor durch glückliche Umstände zur Kristallisation des natürlichen l-Stercobilins<sup>2)</sup> aus Kot (12—16). Ich brauche die Geschichte des Zufalls, der hier eine Rolle spielte, nicht zu wiederholen, da ich sie andernorts bereits erzählte (17). Die Kristalle sind mit denjenigen des mit KAY (18) 30 Jahre später synthetisierten (racemischen) Stercobilins identisch. Die Totalsynthese letzterer Substanz wurde 1966 von PLIENINGER und LERCH veröffentlicht (19). Vor kurzem haben PLIENINGER und seine Mitarbeiter ein l-Stercobilin synthetisiert, das der natürlichen Substanz sehr ähnlich, aber

1942 berichteten SCHWARTZ und ich (29) über die Isolierung eines kristallinen, rechtsdrehenden Urobilins aus infizierter menschlicher Fistelgalle, und kurz darauf konnte die gleiche Verbindung aus Stuhl isoliert werden, insbesondere von solchen Patienten, die Breitspektrumantibiotika erhalten hatten (30). Auf die Bedeutung dieses Punktes werde ich zurückkommen. Spätere Untersuchungen dieses kristallisierten d-Urobilins<sup>2)</sup> und Urobilinogens zusammen mit LOWRY (31, 32) zeigten, daß es nicht ein Stereoisomer von l-Stercobilin  $H_{46}$  ist, sondern weniger gesättigt ist, nämlich  $H_{42}$ . In Abbildung 1 oben Mitte steht die wahrscheinlichste Formel dieses Urobilinogens. Der Charakter dieser ge-



ringeren Sättigung wurde eingehend von GRAY und NICHOLSON (33) studiert, die einen klaren Hinweis darauf geben, daß die Retention einer der ursprünglichen Vinylgruppen des Bilirubins dieses bewirkte. Als Hauptbeweis dafür fanden sie bloß ein Mol Methyläthylmaleinimid bei der Chromsäureoxydation. Dagegen liefert das i-Urobilin  $H_{42}$  zwei Mol Methyläthylmaleinimid, also der Diäthyl-Verbindung entsprechend. GRAY und NICHOLSON haben auch zeigen können, daß die katalytische Reduktion des (Monovinyl) d-Urobilins bei Zugabe eines Mols Wasserstoff ein Diäthyl-d-Urobilin  $H_{42}$  ergab (Abb. 1). Jüngste Arbeiten haben in unserem Labor mit Hilfe des Massenspektrometers bewiesen, daß dieses verhältnismäßig gesättigte d-Urobilin auch in der Natur vorkommt (s. u.). Sein Molekulargewicht beträgt 590, während das des weniger gesättigten Monovinyl d-Urobilin  $H_{40}$  588 ist. Es wird angenommen, daß die unten bewiesene Diäthylverbindung auch das d-Enantiomer eines natürlich vorkommenden Racemates oder i-Urobilin  $H_{42}$  bzw. Urobilinogen  $H_{44}$  ist, mit den Massenzahlen 590 bzw. 592 und, daß jene Substanz, d- oder i-, bei einigen Individuen der einzige Vertreter der Urobilinoid-Chromogene in den Exkrementen ist.

Das in der Natur vorkommende, in Abbildung 1 gezeigte i-Urobilinogen-Racemat ist in seiner Kristallstruktur und Brutto-Formel mit synthetischem Mesobilirubinogen identisch. Das entsprechende natürliche Urobilin, welches durch einfache Entfernung von Wasserstoff aus diesem Chromogen hervorgeht, kann leicht in seine d- und l-Komponente zerlegt werden (34). Doch sei bemerkt, daß das synthetische i-Urobilinogen nicht einfach ein racemisches Gemisch ist, sondern daß es alle möglichen Diastereoisomere enthält, d. h. sowohl RR, SS, RS und SR, während die natürliche Form lediglich aus RR und SS zusammengesetzt ist (35). Wie in Abbildung 2 gezeigt, sind diese Symbole

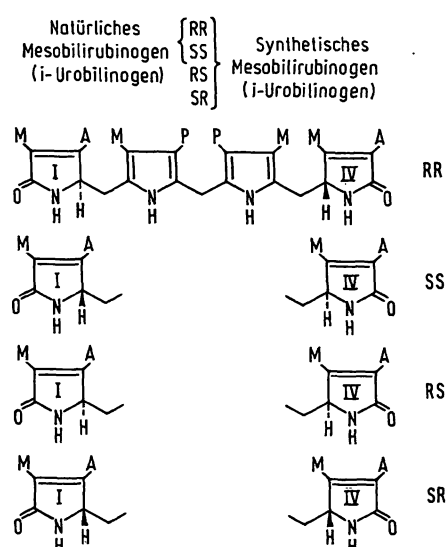


Abb. 2

Stereochemische Unterschiede zwischen natürlichem und synthetischem i-Urobilinogen oder Mesobilirubinogen

Natürliches Mesobilirubinogen (i-Urobilinogen) { RR } Synthetisches Mesobilirubinogen (i-Urobilinogen)  
 { SS }  
 { RS }  
 { SR }

stereochemische Bezeichnungen nach dem Vorschlag von CAHN und Mitarbeitern (36). Sie beziehen sich auf die Orientierung des Wasserstoffs der asymmetrischen Zentren. Wegen dieser relativen Kompliziertheit der synthetischen Form gestaltet sich die Auflösung in seine optisch aktiven Komponenten viel schwieriger und gelang bis jetzt nur teilweise. Schuld daran haben natürlich die störenden optisch inaktiven RS und SR Komponenten.

Die von FISCHER und MEYER-BETZ bewiesene kristallographische Identität des Harn-Urobilinogens mit synthetischem Mesobilirubinogen ist nicht unvereinbar mit derartigen stereochemischen Unterschieden, die eben besprochen wurden. Es ist möglich, daß das von FISCHER und MEYER-BETZ isolierte Urobilinogen ebenso wie dasjenige, welches ich später in einem Fall von hämolytischem Ikterus aus Urin isolierte (37), tatsächlich das Urobilinogen (Mol.-Gew. 592)  $H_{44}$  war, das sich ausschließlich aus den Komponenten RR und SS zusammensetzte. Doch erlaubten weder die damals verfügbaren physikalischen Methoden die Bestimmung des entscheidenden Molekulargewichts, noch wurde der Versuch unternommen, das entsprechende Urobilin aufzulösen. Deswegen darf man andere Möglichkeiten nicht ausschließen. In dieser Beziehung konnte in den letzten Jahren wiederholt ein neuer und hochinteressant zusammengesetzter Urobilinogentyp aus bestimmten Faeces kristallisiert werden, erstens bei einem Fall von Lebercirrhose mit leichter hämolytischer Anämie, später besonders bei einem Fall von atypischem hämolytischem Ikterus nach Tetracyclin-Therapie.

Dieses bemerkenswerte Chromogen enthielt ein d-Urobilinogen  $H_{44}$  (34), zusammen mit einem bis dahin noch nicht beschriebenen Urobilinoidchromogen  $H_{46}$ , von dem jetzt gezeigt wurde, daß es einen gesättigten Endring enthält, wie er charakteristisch für Stercobilin ist und daß der andere Endring ungesättigt ist, wie in d- oder i-Urobilin. Wir haben dieser Substanz den Trivialnamen Halb-Stercobilinogen gegeben, einfach um anzudeuten, daß sie bezüglich des Wasserstoffs halbwegs zwischen den Urobilinen und den Stercobilinen steht (38). Das eigenartige Chromogen ist ein Quasi-Racemat.

Die eigentlichen Urobiline und die entsprechenden Urobilinoide sind Dipyrrolinone, das neue „Halb-Stercobilin“ (38) bzw. sein Chromogen ist ein Pyrrolinon-Pyrrolidon und das Stercobilin ist ein Dipyrrolidon. An dieser Stelle will ich kurz die Unterschiede in den Eisenchlorid-Farbreaktionen dieser 3 Gruppen besprechen. Die allgemeinen Grundlagen dieser Methode wurden kürzlich eingehend beschrieben (39). Es mag hier genügen, daß die Dipyrrolinone mit beiden ungesättigten Endringen, wie d- oder i-Urobiline, gegenüber Eisenchloridoxydation am wenigsten stabil sind. Sie werden zunächst rasch in ein labiles Mesobiliviolin umgewandelt ( $\lambda$  max. bei 560 nm) und sodann zum blaugrünen Glucobilin ( $\lambda$  max. 650 nm). Im Gegensatz hierzu bilden die Dipyrrolidone, also die Stercobiline ( $\lambda$  max. 490 nm), weder Mesobiliviolin

Abb. 3

Einteilung und Eigenschaften der Urobilinoide  
entsprechend der Endring-Sättigung

Substituenten s. Legende Abbildung 1

Klasse	Charakterisierung		FeCl <sub>3</sub>		
			Verhältnisse		Typ
I	Dipyrrolinon Mol.-Gew. 590 oder 588 (ein Vinyl statt Äthyl)		~0,02	0,03	Glucobilin
II	Pyrrolinon-Pyrrolid- on, Mol.-Gew. 592 Halb-Stercobilin		~1,0	6,0	Stabiles Mesobiliviolin
III	Dipyrrolidon Mol.-Gew. 594 Stercobilin		~10,0	10,0	Stercobilin

noch Glucobilin<sup>3)</sup>. Halb-Stercobilin bildet ein andersartiges, stabiles Mesobiliviolin (40), in welchem ein Endring gesättigt ist. Diese Halbsättigung schützt den entsprechenden Endring gegen die Oxydation. Deswegen wird das Halb-Stercobilin während des Routineverfahrens nicht zu Glucobilin umgewandelt, und aus demselben Grund wird nur ein Teil des Halb-Stercobilins zur stabilen Form des Mesobiliviolins umgewandelt. Die Unterschiede zwischen den 3 Gruppen lassen sich einfach durch die Verhältnisse der Endprodukte zueinander (Quotienten der Endprodukte) ausdrücken. Das Verhältnis I ist die Menge unveränderten Urobilinoide, hauptsächlich Stercobilin, gegenüber (stabilem) Mesobiliviolin plus Glucobilin; Verhältnis II ergibt sich aus der Menge Mesobiliviolin durch Glucobilin. Die Erfahrung mit dieser Methode hat gelehrt, daß die hier besprochenen Verhältnisse Charakteristika der 3 Gruppen darstellen (Abb. 3). Es ist klar, daß man beträchtliche Erkenntnisse über die Zusammensetzung von Gemischen erhalten kann, wenn man die Veränderung der Quotienten im Vergleich mit bekannten Reinsubstanzen betrachtet (39). Es ist ebenso verständlich, daß dieses Vorgehen nicht die Unterscheidung der natürlichen Dipyrrolinone wie d- oder i-Urobilin erlaubt, da beide gleich niedrige Quotienten bei der Eisenchlorid-Reaktion ergeben. Die Ergebnisse der Eisenchlorid- und Chromsäure-Oxydationsmethode korrelieren sehr gut miteinander, obwohl die erstere auf Entfernung von Wasserstoff, die letztere auf Abbau zu niedrigen Bausteinen beruht. Zwei Mol Hämatinimid ergeben sich bei der CrO<sub>3</sub> Oxydation<sup>4)</sup> aus allen drei Klassen, außerdem (Abb. 4) zwei Mol Methyläthylmaleinimid aus den Dipyrrolinonen; zwei Methyläthylsuccinimid aus den Dipyrrolidonen und je ein Mol beider Substanzen aus den Pyrrolinon-Pyrrolidonen (38, 40).

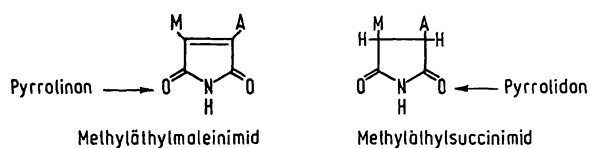


Abb. 4

Derivate der Chromsäureoxydation der Urobilinoide

Zunächst glaubten wir, daß d- und i-Urobilin mittels der Eisenchloridfarbreaktion unterschieden werden könnten, doch basierte diese Annahme auf dem Gebrauch *synthetischen* i-Urobilins; später wurde ermittelt, daß dieses zwar wechselnde, aber doch bedeutsame Mengen eines synthetischen Halb-Stercobilins enthält, welches insbesondere den Quotienten II zu Zwischenwerten erhöht. Die offensichtliche Unterscheidungsmöglichkeit beruht demnach auf der inhomogenen Zusammensetzung synthetischen i-Urobilins (39). Natürliches i-Urobilin ist ein homogenes Dipyrrolinon, und seine Eisenchloridquotienten sind vollständig vergleichbar mit denen des d-Urobilins. So muß die Unterscheidung in jedem Fall auf der Messung der optischen Aktivität beruhen. Mit empfindlichen Spektralanalysen wie dem Cary 60 lassen sich an kleinen Mengen (bis 100 µg) Messungen vornehmen.

Lassen Sie mich nun zu dem bereits erwähnten Quasiracemat, d. h. dem zusammengesetzten Urobilinoide-Chromogen zurückkehren. Die Kristalle erwiesen sich als kristallographisch identisch mit jenen von synthetischem oder natürlichem i-Urobilinogen (Mesobilirubinogen). Doch war diese neue Verbindung offenbar kein reines Dipyrrolinon, denn das aus diesen farblosen Kristallen gebildete orange Urobilinoide-Pigment enthielt sowohl ein Dipyrrolinon d-Urobilin mit dem Molekulargewicht 590 als auch ein Pyrrolinon-pyrrolidon „l-Halb-Stercobilin“ mit dem Molekulargewicht von 592 (34, 42). Mit anderen Worten, die ursprüngliche Verbindung zeigt die Assoziation in homogenen Kristallen von zwei Chromogenen, die in Abhängigkeit von der Sättigung ihres Endringes unterschiedliche Molekulargewichte haben. Es ist klar,

<sup>3)</sup> Bei dieser Reaktion tritt regelmäßig auch eine gewisse, geringere Oxydation zu Monopyrrolfragmenten ein. Andernorts (39) haben wir den Nachweis dieser Substanzen mittels Dünnschicht- und Gaschromatographie nach Chromsäure- und Eisenchloridoxydation besprochen.

<sup>4)</sup> Durchgeführt mit nachfolgender Dünnschichtchromatographie auf Silica Gel nach der Mikromethode von W. RÜDIGER (41).

Tab. 1  
Bildung von Urobilinoide aus Bilirubin oder Mesobilirubin bei verschiedenen Proben menschlicher Faeces

Faeces-Probe	1	2	3	4	5
Natives Urobilinoide Klasse (durch $\text{FeCl}_3$ )	II = III (l-Halb-Stercobilin = l-Stercobilin)	II = III (l-Halb-Stercobilin = l-Stercobilin)	II > I (l-Halb-Stercobilin > d-Urobilin)	II > I (l-Halb-Stercobilin > d-Urobilin)	II > I (l-Halb-Stercobilin > d-Urobilin)
Substrat (mg) Bilirubin Mesobilirubin	40	80	80	80	60
Urobilinoide gebildet (mg)	14	27	12,8	8,7	27
Urobilinoide, Klasse (durch $\text{FeCl}_3$ )	III	II > I	I	I	I
( $\Delta$ ) <sub>D</sub>	-3480	-2870	+5220	+5260	+4500
Typ	l-Stercobilin	l-Halb-Stercobilin d-Urobilin	d-Urobilin	d-Urobilin	d-Urobilin
m/e-Wert	594	592 590	590	590	588

daß in diesem zusammengesetzten Chromogen einfach das l-Halb-Stercobilinogen das l-Enantiomer des natürlichen i-Urobilinogens ersetzt hat. Obgleich solche natürlichen Quasiracemate diesen Typs, wobei die optischen Komponenten unterschiedliche Molekulargewichte haben, sehr selten sind, wurden doch zwei Beispiele davon in der Natur bekannt, beide aber von pflanzlichem Ursprung. BENTLEY (43) hat kürzlich das Problem der Quasiracemate bearbeitet. Unser Beispiel ist das erste tierischen Ursprungs. Vom Standpunkt des ganzen Problems der Biologie der Urobilinoide kommt diesem zusammengesetzten Chromogen größte Bedeutung zu, doch bevor ich auf unsere derzeitige Auffassung der natürlichen Entstehung dieser Substanzen zu sprechen komme, möchte ich einige Bemerkungen machen über ausgedehnte Untersuchungen zur bakteriellen Reduktion der Gallenfarbstoffe *in vitro*, wie sie während des letzten Jahrzehntes durchgeführt und kürzlich ausführlich beschrieben wurden (44, 45). Hierbei wurde die reduzierende Aktivität eines reinen *Clostridia*-Stammes verglichen mit verschiedenen Proben aus menschlicher Stuhlflora hinsichtlich ihrer Fähigkeit Urobilinoide aus Bilirubinoid-Substrat zu bilden, d. h. eine Reduktion der 2'7<sup>3</sup>-Stellungen. PASSINI und CZACKES (46) haben 1922 berichtet, daß in Reinkulturen von Anaerobiern aus menschlichen Faeces Bilirubin zu Urobilin reduziert würde, was jedoch bisher nicht bestätigt wurde. KÄMMERER und MILLER (47) meinten kurz danach, es sei ein Synergismus zwischen *E. coli* und *B. putrificus* notwendig, um diese Reduktion zu vollziehen. Später hat BAUMGÄRTEL (48) für die Entstehung des Stercobilins einen ähnlichen Synergismus zwischen *E. coli* und bestimmten Anaerobiern postuliert. In neuerer Zeit konnten GUSTAFSSON und LANKE (49) in einem sehr interessanten Versuch zeigen, daß ein *Clostridia*-Stamm, den sie aus normalem Rattenkot züchteten, dann, wenn er keimfrei gehaltenen Ratten gegeben wurde, binnen kurzem Urobilinoide im Stuhl erscheinen ließ, die zuvor bei keimfreien Ratten völlig gefehlt hatten. Diese Beobachtung ist natürlich von größter Bedeutung für die enterogene Theorie, die FRIEDRICH v. MÜLLER's Arbeit so sehr unterstützte. Den *Clostridia*-Stamm erhielten wir aus Stockholm durch die Lebenswürdigkeit von Herrn Professor GUSTAFSSON.

Beim Wachstum in der Kultur sind die GUSTAFSSON-*Clostridien* imstande, Bilirubin zu Urobilinoide zu reduzieren, hauptsächlich zu jenen der Dipyrrolidon-(l-Stercobilin) oder Pyrrolinon-iden-(l-Halb-Stercobilin) Klasse. Zugefügte *E. coli* hatten überhaupt keinen Einfluß, also ergab sich hier kein Beweis für einen Synergismus<sup>5)</sup>. Dipyrrolinone (d- oder i-Urobiline) traten nur gelegentlich und in kleinen Mengen auf. Im Gegensatz (44, 45) dazu bilden sich bei der Inkubation aus menschlichen Faeces von Bilirubin, Mesobilirubin oder Dihydromesobilirubin mit der Flora oft Dipyrrolinone, und in mehreren Experimenten wurde ausschließlich d-Urobilin gebildet (45). Von besonderem Interesse waren jene Experimente, bei denen die Produkte der bakteriellen Reduktion isoliert und sowohl massenspektrometrisch als auch mittels der Eisenchloridoxydation und bezüglich ihrer optischen Aktivität untersucht wurden. Unter gleichen Wachstumsbedingungen und mit gleichem Substrat, sei es Bilirubin, Mesobilirubin oder Dihydromesobilirubin, lief bei einigen fäkalen Proben die Reduktion nur bis zum d-Urobilin, bei anderen zum l-Halb-Stercobilin oder l-Stercobilin (Tab. 1). Auch war es sehr wichtig, daß gewisse Proben d-Urobilin zu l-Stercobilin reduzieren konnten, also eine Inversion, während andere unfähig waren, diese Reaktion auszuführen (50, 51). Diese Unterschiede im Reduktionsvermögen standen in keiner Beziehung zum natürlich ausgeschiedenen Urobilinoid-Muster. Fäkalen Proben, die nur l-Stercobilin enthielten, haben oft nur d-Urobilin oder Mischungen aus d-Urobilin und Halb-Stercobilin gebildet. Dieses Phänomen läßt sich wohl am besten erklären, wenn man die nichtoptimalen Bedingungen für Wachstum und Stoffwechsel im Reagenzglas mit jenen im Colon vergleicht (Tab. 2). Und doch können solche Bedingungen offenbar bisweilen im menschlichen Caecum vorliegen, in welchem auch bei Normalpersonen, die keine Antibiotika erhielten, nur Dipyrrolinone, d- oder i-U, in anderen nur l-Halb-Stercobilin, l-Stercobilin oder verschiedene Gemische als Beweis einer wirksameren Reduktion gefunden werden. Man sieht, wie die Reduktion vom Caecum bis zum Sigmoid fortschreitet,

<sup>5)</sup> Doch muß erwähnt werden, daß GUSTAFSSON und LANKE (49) einen solchen Synergismus im Colon der keimfreien Ratten vorgeschlagen hatten.

Tab. 2

Umwandlung von d-Urobilin zu l-Stercobilin durch normale Stuhl-  
bakterien (Exp. 45, 2. 9. 65)

TSA Medium, 150 ml
Menschliche Faeces*, 150 mg
d-Urobilin, 15 mg ( $\alpha_D = +4458$ )
Mol.-Gew. 590, Eisenchloridverhältnisse I, II = 0,02; 0,01 = Klasse I, reines Dipyrrolinon
Inkubation 6 Tage bei 37°C
Abgeleitetes kristallines Urobilinoide ( $\alpha_D = -3240$ )
Eisenchloridverhältnisse I, II = 10,0; 9,0 = Klasse III, reines Dipyrrolidon, l-Stercobilin
*Natives Urobilinoidechromogen, 19 mg/100 g
Eisenchloridverhältnisse I, II = 0,6; 1,2 = Mischung von Klasse I (Dipyrrolinon) und Klasse II (Pyrrolinon-Pyrrolidon)

obwohl sie zeitweise im Caecum schon vollendet ist (Tab. 3). Entsprechend ist es nicht zu erwarten, daß Harn-Urobilin einheitlich ist, sondern es variiert in seiner Zusammensetzung abhängig von der im Dickdarm, hauptsächlich im Caecum vorkommenden Reduktion des Bilirubins und Reabsorption der Produkte. Bei normalen Individuen ist es meistens Stercobilin, doch kann es zum Beispiel bei hämolytischer Anämie ein wechselndes Gemisch weniger gesättigter Urobilinoide sein, sogar d-Urobilin.

Es mag an dieser Stelle hilfreich sein, wieder auf unser Diagramm zurückzugreifen (Abb. 1), das die verschiedenen Wege zeigt, auf denen die bakterielle Flora Bilirubin oder seine unmittelbaren Abkömmlinge eventuell zu l-Stercobilinogen reduziert. Der Nachweis, daß 3 derartige Wege existieren, wurde erbracht, wobei jeder zur letzten Stufe in der Reduktion, nämlich zum l-Stercobilinogen führen kann.

Ich erwähnte bereits die weniger gesättigte Substanz, wahrscheinlich Monovinyl-d-Urobilinogen, das aus Bilirubin über Dihydrobilirubin gebildet wird. Letzteres wird gewöhnlich durch Reduktion der zweiten Vinylgruppe gerade noch zu Mesobilirubin transponiert. Warum die Bakterien unter eigentümlichen Bedingungen trotz Anlagerung von drei Mol Wasserstoff die eine Vinylgruppe nicht reduzieren, ist noch unklar. Interessanterweise haben wir dieses einfach (mono-)

ungesättigte d-Urobilin wiederholt aus normalen Hunde-Faeces kristallisieren können. Die schon länger zurückliegende Beobachtung in unserem Labor (30), daß Breitbandantibiotika wie Tetracyclin die reduzierende Fähigkeit der Bakterienflora derart beeinflussen, daß zuerst gar keine Reduktion vorkommt, dann für eine gewisse Zeit<sup>6)</sup> nur dieses ungesättigte d-Urobilin entsteht, läßt vermuten, daß die Bakterien im allgemeinen größere Schwierigkeiten haben bei der Reduktion gerade der einen im Vergleich mit der anderen Vinylgruppe im Bilirubin. Es liegt nahe zu vermuten, daß die innere Vinylgruppe wegen sterischer Behinderung schwieriger zu reduzieren sein dürfte. Es konnte gezeigt werden, daß Diäthyl-d-Urobilinogen durch Reduktion aus natürlichem Dihydromesobilirubin gebildet werden kann, welches aller Wahrscheinlichkeit nach ein racemisches Gemisch ist. Dihydromesobilirubin ist offenbar eine multipotentielle Zwischen-substanz, weil es nur ein asymmetrisches Zentrum besitzt, also ein relativ einfaches (d-, l- oder RS) Racemat darstellt. In jüngster Zeit (45) ist jedoch gezeigt worden, daß bestimmte Stuhlproben beide optische Komponenten, auch l-, hauptsächlich zum d-Urobilinogen  $H_{44}$  reduzieren. Unter anderen Bedingungen des Bakterienstoffwechsels und Reduktionspotentials wird Dihydromesobilirubin direkt zum Racemat, d. h. d-, l- oder i-Urobilinogen reduziert. Es ist anzunehmen, daß die d-Komponente in diesem racemischen Gemisch dem bereits erwähnten (Abb. 1) Diäthyl-d-Urobilinogen gleich ist. Unter optimalen Bedingungen wird es zu l-Halb-Stercobilinogen und l-Stercobilinogen umgewandelt (Tab. 2), aber die Schleife (Abb. 1) soll andeuten, daß die Bakterien diese Umwandlung schwieriger vollbringen im Gegensatz zur l-Komponente

<sup>6)</sup> Nach längerer Zeit, auch bei fortdauernder Einnahme des Tetracyclins, kann eine „Restitutio ad integrum“ vorkommen, d. h. eine Reduktion bis zum l-Stercobilinogen wird vollendet, was höchstwahrscheinlich das Auftreten eines neuen, widerstandsfähigen Bakterienstammes bedeutet.

Tab. 3

Unterschiede der Urobilinoide im Colon (Caecum oder Sigmoid) bei verschiedenen Individuen. Die Eisenchlorid-Verhältnisse wurden nach früheren Beobachtungen (59) neu berechnet (39)

Fall	Herkunft	Ausbeute der Oxydation mit FeCl <sub>3</sub> ( $\mu$ g)			FeCl <sub>3</sub> -Verhältnisse		Urobilinoideotyp
		Glucobilin	Mesobiliviolin II	nicht umgesetztes l-Stercobilin	I	II	
50	Caecum	26	4,3	20	0,7	0,17	d- oder i-Urobilin, l-Halb-Stercobilin, l-Stercobilin
	Sigmoid	19	67	45	0,5	3,6	l-Halb-Stercobilin, d- oder i-Urobilin
55	Caecum	28	73	39	0,4	2,6	l-Halb-Stercobilin, d- oder i-Urobilin
	Sigmoid	0	119	115	1,0	$\infty$	l-Halb-Stercobilin
57	Caecum	146	27	4,2	0,02	0,19	d- oder i-Urobilin, l-Halb-Stercobilin
	Sigmoid	37	10	4,4	0,09	0,28	d- oder i-Urobilin, l-Halb-Stercobilin
58	Caecum	1,8	38	71	1,8	21	l-Halb-Stercobilin, l-Stercobilin
	Sigmoid	0,2	5	83	16	26	l-Stercobilin
59	Caecum	0,6	22	121	5	36	l-Stercobilin
	Sigmoid	0,4	7	100	14	17	l-Stercobilin
60	Caecum	178	8	2	0,01	0,04	d- oder i-Urobilin
	Sigmoid	94	71	9,1	0,06	0,8	d- oder i-Urobilin, l-Halb-Stercobilin



(45). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, daß so eine Inversion zusätzliche Aktivierungsenergie verlangt, wofür zwei Faktoren in Betracht kommen: Erstens: Die natürlichen Urobilinoide und ihre Chromogene sind, wenigstens in Chloroform, eher in sich gewunden und nicht linear, wie sie im allgemeinen, auch hier, gezeichnet werden. ALBERT MOSCOWITZ und seine Mitarbeiter zeigten, daß die Windungen durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zustande kommen (52). Zusätzliche Aktivierungsenergie wird zur Umwandlung von d- nach l- benötigt, denn diese geht einher mit einer Streckung und Wiederwindung bis zum l-Enantiomer, bei gleichzeitiger weiterer Reduzierung. Jedoch ist die Windung des Moleküls in vivo weniger bedeutend, da in wäßriger Lösung die Wasserstoffbrücken eine geringere Rolle spielen. Die diesbezüglichen Bedingungen im Caecum sind noch nicht studiert worden. Zweitens: Ohne Zweifel benötigt die Inversion selber zusätzliche Energie, die nicht von der Windung abhängig zu sein braucht.

Demgemäß sind die Bakterien weniger fähig, die Inversion der d-Form zu erledigen, obwohl sie die l-Komponente verhältnismäßig leicht und direkt zu l-Halb-Stercobilinogen reduzieren können. Diese Hypothese bietet die einleuchtendste Erklärung für die oben geschilderte bemerkenswerte quasi-racemische Form, und für das häufige Auftreten des d-Urobilinogens, auch in Kulturen von normalen l-Stercobilin enthaltenden Faeces. Normalerweise führt die Bakterienflora die Reduktion recht vollständig und schnell bis zum l-Stercobilinogen durch und überwindet dabei leicht irgendwelche Hindernisse zwischen d- und l-. Die Hauptfrage ist, warum die Bakterien eine solche Inversion überhaupt durchführen. Es ist klar, daß bei niedriger Sättigung, wie beim Dihydromesobilirubin, die Inversion von l- nach d- tendiert, während d-Urobilinogen zunächst l-Halb-Stercobilinogen und schließlich l-Stercobilinogen wird. Rechtsdrehende Isomere der beiden letztgenannten Substanzen haben wir nie beobachtet.

Ich darf hier betonen, daß alle diese neueren Arbeiten über die Natur und die Biogenese der Urobilinoide nicht zustande gekommen wären ohne die Beiträge meiner Mitarbeiter: Prof. A. MOSCOWITZ, Drs. D. A. LIGHTNER, Z. J. PETRYKA, EUGENIA DAVIS und Frä. MARY WEIMER.

Jetzt ist es, glaube ich klar, daß unsere Beobachtungen jene Schlußfolgerung FRIEDRICH v. MÜLLER's unterstützen, daß Urobilin enterogen gebildet wird. Doch wäre ich nachlässig, wenn ich nicht erwähnte, daß T. BAUMGÄRTEL hier in München eine Zeit lang die hepatische Theorie des Ursprungs der Urobilinoide wieder belebte (48). Seinen anregenden, dualistischen Vorstellungen nach ist alles natürliche Urobilinogen hepatischen Ursprungs und alles Stercobilinogen enterogen gebildet.

Doch, worauf schon FRIEDRICH v. MÜLLER's Experimente hinwiesen und was wir bestätigen konnten: Urobilinoide jeglichen Typs fehlen bei komplettem

Gallengangverschluss sowohl im Urin als auch im Stuhl. BAUMGÄRTEL erklärte das Fehlen von Urobilinogen im Urin durch die Annahme eines „Enzym-Blocks“ in der Leber. Er dachte, daß der hohe Serum-bilirubinspiegel eine enzymatische Urobilinogen-Bildung in der Leber ausschalte. Aber solche enzymatische Störungen sind durch freies, nicht konjugiertes Bilirubin bedingt. Hauptsächlich das letztere ist aber beim Gallengang-Verschluß erhöht. Außerdem stimmte diese Annahme nicht mit früheren Untersuchungen von McMASTER und Mitarbeitern (53) am Rockefeller-Institut überein, die nachgewiesen hatten, daß sich im Urin und Stuhl von Hunden mit einer vollständigen äußeren Gallenfistel weder bei normaler noch bei gestörter Leberfunktion Urobilin fand. Doch sobald Galle verfüttert wurde, erschienen Urobilinoide prompt in beiden. Dies stimmt auch mit Beobachtungen von FISCHLER (54) hier in München überein, daß nämlich Hunde mit einer totalen Gallenfistel nur dann Urobilinoid im Urin hatten, wenn sie an ihrer Fistel etwas Galle lecken konnten. FISCHLER postulierte jedoch, daß bei gewissen hepatocellulären Schäden Urobilinogen in der Leber gebildet würde. G. UGARTE, der vor einigen Jahren in unserem Labor arbeitete, erzeugte bei einem Hund einen Ikterus durch Toluyldiamin nach der alten Methode von STADELMANN (55). Der Urin zeigte einen starken Anstieg an Urobilinoid-Chromogen, gemessen mit der EHRlich'schen Reaktion. Als der Hund sich von der Vergiftung erholt hatte, wurde eine totale äußere Gallenfistel angelegt und erneut Toluyldiamin gegeben. Obwohl sich wieder ein Ikterus gleichen Ausmaßes wie zuvor einstellte, stieg das Urobilinogen im Urin nicht an (was es vor der Gallenfistel getan hatte) (56).

Nach BAUMGÄRTEL's Hypothese kann in der Leber gebildetes Urobilinogen im Darm nicht in Stercobilinogen umgewandelt werden, aber mit LOWRY zusammen konnten wir das sehr wohl zeigen, indem wir <sup>15</sup>N-markiertes kristallines Mesobilirubinogen benutzten (57). Bei Inkubationsversuchen mit menschlichen Faeces wurde dieses rasch in <sup>15</sup>N-l-Stercobilinogen umgewandelt. Außerdem, wie oben beschrieben, wurde in bestimmten Fällen wiederholt im Caecum oder im Stuhl festgestellt, daß alles Urobilinoid entweder d- oder i-Urobilinogen war, ohne daß Stercobilinogen nachweisbar war. In solchen Fällen, in denen nur Dipyrrolinone, also d- oder i-Urobilinogen ausgeschieden wird, müßte man nach BAUMGÄRTEL postulieren, daß alle gebildeten Gallenfarbstoffe von der Leber zu Urobilinogen umgewandelt wurden, und daß in der Galle kein Bilirubin ausgeschieden wird, welches von der Darmflora zu Stercobilinogen hatte umgewandelt werden können. Doch einer unserer Patienten, der ausschließlich i-Urobilinogen (natürliches Racemat) im Stuhl ausschied, hatte große Mengen Gallen-Bilirubin und Bilirubin-Calcium-Gallensteine (58). Hier war es also ganz klar, daß das i-Urobilinogen durch die Aktivität der Darmflora aus Gallen-Bilirubin gebildet wurde, also mit anderen Worten, enterogen entstand.



## Literatur

1. v. MÜLLER, F., Jber. Schles. Ges. vaterländ. Kultur, Breslau, 1892 Med. Sekt. — 2. WELTMANN, O., Wien. klin. Wschr. 36, 389 (1923). — 3. FISCHER, H., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 73, 204 (1911). — 4. FISCHER, H. und F. MEYER-BETZ, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 75, 232 (1911). — 5. JAFFÉ, M., Centralbl. Med. Wissensch. 6, 24 (1868). — 6. VAN LAIR, C. F. und J. B. MASius, Centralbl. Med. Wissensch. 9, 369 (1871). — 7. MALY, R., Ann. Chem. 161, 368 (1871). — 8. LE NOBEL, C., Pflüger's Arch. 40, 501 (1887). — 9. EHRLICH, P., Med. Woche 2, 115 (1901). — 10. NEUBAUER, O., Münch. Med. Wschr. 50, 1846 (1903). — 11. PETRYKA, Z. J. und C. J. WATSON, Tetrahedron Letters 52, 5323 (1967). — 12. WATSON, C. J., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 204, 57 (1932). — 13. WATSON, C. J., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 208, 101 (1932). — 14. WATSON, C. J., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 221, 145 (1933). — 15. WATSON, C. J., J. biol. Chemistry 105, 469 (1934). — 16. WATSON, C. J., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 233, 39 (1935). — 17. WATSON, C. J., Ann. Int. Med. 70, 839 (1969). — 18. KAY, I. T., M. WEIMER und C. J. WATSON, J. biol. Chemistry 238, 1122 (1963). — 19. PLIENINGER, H. und N. LERCH, Ann. Chem. 296, 698 (1966). — 20. PLIENINGER, H., Pers. Mitteil. — 21. WATSON, C. J., J. biol. Chemistry 200, 691 (1953). — 22. FISCHER, H., H. HALBACH und A. STERN, Ann. Chem. 219, 254 (1935). — 23. WATSON, C. J. und Z. J. PETRYKA, Analytic. Biochem. 30, 156 (1969). — 24. GRAY, C. H., G. A. LEMMON und D. C. NICHOLSON, J. Chem. Soc. (C) 178 (1967). — 25. NICHOLSON, D. C. in Bilirubin Metabolism., ed., I. A. D. Bouchier and B. H. Billing, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, (1967) p. 75. — 26. LEMBERG, R., Nature (London) 134, 422 (1934). — 27. FISCHER, H. und H. HALBACH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 238, 59 (1936). — 28. SIEDEL, W. und E. MEIER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 242, 101 (1936). — 29. SCHWARTZ, S. und C. J. WATSON, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49, 643 (1942). — 30. SBOROV, V. M., A. R. JAY und C. J. WATSON, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 37, 52 (1951). — 31. LOWRY, P. T. und C. J. WATSON, J. biol. Chemistry 218, 641 (1956). — 32. WATSON, C. J. und P. T. LOWRY, J. biol. Chemistry 218, 633 (1956). — 33. GRAY, C. H. und D. C. NICHOLSON, J. Chem. Soc. 3085 (1958). — 34. WATSON, C. J., D. A. LIGHTNER, A. MOSCOWITZ, E. DAVIS, Z. J. PETRYKA und M. WEIMER, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 223 (1968). — 35. WATSON, C. J., A. MOSCOWITZ, D. LIGHTNER, W. C. KRUEGER und M. WEIMER, J. biol. Chemistry 241, 5037 (1966). — 36. CAHN, R. S., C. INGOLD und V. PRELOG, Angew. Chem., Internat. Edit. 5, 385 (1966). — 37. WATSON, C. J., J. biol. Chemistry 114, 47 (1936). — 38. WATSON, C. J., A. MOSCOWITZ, D. A. LIGHTNER, Z. J. PETRYKA, E. DAVIS und M. WEIMER, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1957 (1967). — 39. WATSON, C. J., M. WEIMER, Z. J. PETRYKA, D. A. LIGHTNER, A. MOSCOWITZ, E. DAVIS und N. A. BEACH, Arch. Biochem. Biophysics 131, 414 (1969). — 40. PETRYKA, Z. J., C. J. WATSON, E. DAVIS, M. WEIMER, D. LIGHTNER und A. MOSCOWITZ, Tetrahedron Letters 57, 5983 (1968). — 41. RÜDIGER, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 129 (1967). — 42. LIGHTNER, D. A., A. MOSCOWITZ, Z. J. PETRYKA, S. JONES, M. WEIMER, E. DAVIS, N. BEACH und C. J. WATSON, Arch. Biochem. Biophysics 131, 566 (1969). — 43. BENTLEY, R., Molecular Asymmetry in Biology, in Molecular Biology, Vol. 1, Chap. 6, Acad. Press, New York und London (1970). — 44. WATSON, C. J., J. W. HALL III und M. WEIMER, Biochem. Med. 2 461 (1969). — 45. WATSON, C. J., M. WEIMER, A. MOSCOWITZ, D. A. LIGHTNER, Z. J. PETRYKA und E. DAVIS, Biochem. Med. 2, 484 (1969). — 46. PASSINI, F. und F. CZACKES, Wien. klin. Wschr. 36, 657 (1923). — 47. KÄMMERER, H. und K. MILLER, Dtsch. Arch. klin. Med. 141, 318, (1923). — 48. BAUMGÄRTEL, Tr., Physiologie und Pathologie des Bilirubinstoffwechsels als Grundlagen der Iktcrusforschung, G. Thieme, Stuttgart (1950). — 49. GUSTAFSSON, B. E. und L. S. LANKE, Z. Exp. Med. 112, 975 (1960). — 50. WATSON, C. J., M. CAMPBELL und P. T. LOWRY, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 707 (1958). — 51. WATSON, C. J., M. WEIMER, in Vorbereitung. — 52. MOSCOWITZ, A., W. C. KRUEGER, I. T. KAY, G. SKEWES und S. BRUCKENSTEIN, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 1190 (1964). — 53. MC MASTER, P. D. und R. ELMAN, Ann. Int. Med. 1, 68 (1927). — 54. FISCHLER, F., Physiologie und Pathologie der Leber, J. Springer, Berlin (1925). — 55. STADELMANN, E., Der Icterus, F. Enke, Stuttgart (1891). — 56. WATSON, C. J., J. Clin. Path. 16, 1 (1963). — 57. LOWRY, P. T., N. R. ZIEGLER, R. CARDINAL und C. J. WATSON, J. biol. Chemistry 208, 543 (1954). — 58. BERENDSOHN, S., J. LOWMAN, D. SUNDBERG und C. J. WATSON, Blood 24, 1 (1964).

Prof. Dr. C. J. Watson  
Northwestern Hospital  
810 East 27th Street  
Minneapolis/Min. 55407